

Aus dem Institut für Virologie
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. R. Rott
und
aus dem Institut für Geflügelkrankheiten
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. H. Geissler

**Biologische Eigenschaften des Virus
der infektiösen Bronchitis der Hühner**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Mehmet Kandil
Tierarzt aus Elbistan, Türkei

Gießen 1969
—

Aus dem Institut für Virologie
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. R. Rott

und

aus dem Institut für Geflügelkrankheiten
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. H. Geissler

**Biologische Eigenschaften des Virus
der infektiösen Bronchitis der Hühner**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Mehmet Kandil
Tierarzt aus Elbistan, Türkei

Gießen 1969

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät
in Gießen

Dekan: Prof. Dr. H. Tillmann

Berichterstatter: Prof. Dr. R. Rott

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Dezember 1969



I n h a l t s v e r z e i c h n i s

	Seite
I. Einleitung und Problemstellung	1
II. Das Virus der infektiösen Bronchitis der Hühner	2
III. Material und Methoden	11
1. Virus	11
2. Bestimmung der Infektiosität im bebrüteten Hühnerei	11
3. Antigennachweis mit fluoreszierenden Antikörpern	12
4. Agar-Gel-Mikropräzipitationstest	14
5. Neutralisationstest	15
6. Seren	16
7. Gewebekulturen	16
8. Kulturmedien und Lösungen	18
a) Anzuchtmedien	18
b) Vermehrungsmedium	18
c) Weitere Lösungen	19
IV. Untersuchungsergebnisse	21
1. Entwicklung eines Plaquetestes zur Bestimmung der Infektiosität des Virus der infektiösen Bronchitis der Hühner	21
2. Bestimmung der genauen Bedingungen für den Plaquetest	23
a) Bestimmung der optimalen Virusadsorptionszeit	23
b) Einfluß der Inkubationszeit auf die Plaquezahl	24
c) Bestimmung der optimalen Färbedauer	25
d) Einfluß eines polysaccharidartigen Inhibitors auf die Plaquebildung	25
e) Beziehung zwischen Virusverdünnung und Plaquezahl	26

f) Effekt der Inkubationstemperatur auf die Plaquebildung	26
2. Vergleichende Titration der Infektiosität im Hühnerembryo und im Plaquetest	27
3. Vermehrung des IB-Virus in verschiedenen Zellkulturen	28
4. Untersuchungen mit fluoreszierenden Antikörpern	31
5. Reinigung eines virusspezifischen Antigens für den Agar-Gel-Präzipitationstest	33
6. Neutralisationstest	35
V. Besprechung der Ergebnisse	39
VI. Zusammenfassung	43
VII. Literaturverzeichnis	45
Lebenslauf	

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Die Bearbeitung einer Viruserkrankung ist davon abhängig, ob es gelingt, eine einfache und genügend genaue Nachweismethode zu entwickeln, mit deren Hilfe es möglich ist, infektiöse Viruspartikel quantitativ zu bestimmen. Unsere Kenntnisse über manche wichtige Tierseuchen, z.B. der Rinderleukose, sind u.a. nur deshalb so gering, weil ihre Erforschung ein allzu kostbares Tiermaterial erfordert. Das Virus der infektiösen Bronchitis der Hühner (IB-Virus) läßt sich relativ leicht in den Zellen des embryonierten Hühnereies und in Gewebekulturen von embryonalen Hühnerzellen vermehren, wenn es an eines dieser Wirtssysteme adaptiert wurde. Zum quantitativen Nachweis des Virus konnte sich die Gewebekultur noch nicht genügend durchsetzen. Das mag darin begründet sein, daß die bisher zur Verfügung stehenden Verfahren nicht mit genügender Empfindlichkeit auf möglichst viele Virusstämme ansprechen. Auch das embryonierte Hühnerei ist zum Nachweis des Virus mit gewissen Nachteilen behaftet. So ist bei größeren Reihenuntersuchungen eine statistisch gesicherte quantitative Virusbestimmung im Hühnerei relativ kostspielig. Weiterhin kann sie insofern unsicher werden, als in den Eidottern von Hennen, die sich durch Infektion immunisierten, erhebliche Mengen von Antikörpern vorhanden sein können, die in der Lage sind, eine Infektion des Embryos zu verhindern.

Wir haben deshalb versucht, ein Verfahren zu entwickeln, welches es gestattet, die Anzahl der infektiösen Einheiten des IB-Virus in der Gewebekultur an Hand von lokalen Läsionen (Plaques) reproduzierbar zu bestimmen. Die dafür benötigten Zellen sollten sich leicht in größerer Menge beschaffen und in einfacher Weise züchten lassen. Auch sollte sichergestellt sein, daß das Virus nicht erst an die benutzten Zellen adaptiert werden muß, und daß schließlich ein einzelnes Viruspartikel genügt, einen Plaque hervorzurufen, um damit die Möglichkeit zu haben, genetisch reine Virusstämme zu isolieren. Mit diesem Verfahren sollte es dann möglich sein, das Verhalten des IB-Virus in verschiedenen Zellen in der Gewebekultur zu verfolgen. Schließlich sollte die Brauchbarkeit des Plaquetestes für den Serumnachweis geprüft und mit dem Agar-Gel-Präzipitationstest verglichen werden.

II. DAS VIRUS DER INFEKTIÖSEN BRONCHITIS DER HÜHNER

Der erste Bericht über die Krankheit stammt aus den Vereinigten Staaten von Amerika (Schalk u. Hawn, 1931). Die Autoren stellten damals eine noch unbekannte, verlustreiche Erkrankung der Atmungsorgane bei jungen Küken fest. Bushnell und Brandly (1933) konnten den Viruscharakter des Erregers der infektiösen Bronchitis nachweisen. Es gelang Beach und Schalm (1936) durch serologische

Kreuzversuche, diese von der schon bekannten infektiösen Laryngotracheitis abzutrennen und ferner die Virusätiologie zu bestätigen. In der Folgezeit wurde das Vorkommen der Krankheit auch bei erwachsenen Hühnern mitgeteilt (Beaudette und Hudson, 1937). Das Auftreten der infektiösen Bronchitis wurde zunehmend in verschiedenen Ländern von einer Anzahl von Autoren beobachtet: Asplin (1948) in England, Crawley (1951) in Kanada, Kawasihma (1951) sowie Nakamura (1954) in Japan, Swierstra (1947) und Bijlenga (1956) in Holland, Richter (1956) in Belgien, Ayfantis (1956) in Griechenland, Glassi (1956) und Petek (1956) in Italien, Hipolito (1957 a,b) in Brasilien, Brion (1960) in Frankreich, Köhler und Burtscher (1959) in Österreich, Raggi (1960) in Hawai, Weiss (1962) in Südafrika.

In Deutschland erschien die erste Mitteilung über eine neuartige Erkrankung der Luftwege der Hühner in Bayern, die u.a. mit einer Atemnot verlief (Sassenhof, 1950); ein Zusammenhang mit der infektiösen Bronchitis wurde jedoch nicht erkannt. In den folgenden Jahren wurde das IB-Virus erstmalig im Raum Nord-Württemberg isoliert und mit Hilfe des Agar-Gel-Präzipitationstestes identifiziert (Woernle, 1959).

Aufgrund seiner morphologischen Eigenschaften wird das IB-Virus zusammen mit dem Virus der Mäusehepatitis und mit verschiedenen gleich strukturierten Viren, die beim Men-

schen Infektionen im oberen Respirationstrakt hervorrufen, in die Gruppe der Coronaviren eingeordnet (Almeida et al., 1968). Die Viren dieser Gruppe sind mittelgroße (Durchmesser etwa 1000 Å), kugelförmige oder ellipsoide Partikel, die an ihrer Außenhülle kleine keulenförmige Fortsätze (spikes) tragen (Almeida u. Tyrell, 1967; Becker et al., 1967; Berry et al., 1964; McIntosh et al., 1967). Ihre Nucleinsäure scheint dem Ribosetyp anzugehören, da die halogenierten Pyrimidinnucleoside Jod-, Fluor- und Bromdesoxyuridin, die die DNS-Synthese hemmen, keinen Einfluß auf die Vermehrung dieser Viren hatten (Cunningham, 1963; Esteola, 1966; Hamre u. Procknow, 1966; McIntosh et al., 1967). Über die Struktur des Nucleokapsids ist noch nichts sicheres bekannt.

Das IB-Virus läßt sich relativ einfach in bebrüteten Hühnereiern züchten. Beaudette und Hudson (1937) gelang es erstmalig, das Virus auf der Chorioallantoismembran von bebrüteten Hühnereiern zur Vermehrung zu bringen. Eine einfachere Methode für die Viruszüchtung wurde von Delaplane (1947) entwickelt, indem er das infektiöse Material in die Allantoishöhle von 9 - 10 Tage bebrüteten Hühnereiern injizierte. Nach Inokulation in die Allantoishöhle vermehrt sich das IB-Virus vorwiegend in den Zellen der Chorioallantoismembran. In der Eiflüssigkeit und der Leber wurde nur eine geringere Viruskonzentration festge-

stellt (Cunningham und El Dardiri, 1948). Als charakteristisches Symptom für eine gelungene Bronchitisinfektion im infizierten Ei gilt die Verzweigung des Hühnerembryos. Mit der Anzahl der Eipassagen nimmt die Pathogenität des Erregers der IB für Hühnerembryonen zu, während sich die Pathogenität für Hühner verringert (Delaplane u. Stuart, 1941). Hoch eiadaptierte Stämme führen zum Tod des Embryos.

Über die Züchtung des IB-Virus in der Gewebekultur liegen widersprechende Ergebnisse vor. Das mag darin begründet sein, daß für die Untersuchungen unterschiedliche Virusstämme benutzt wurden. Soviel scheint jedoch sicher zu sein, daß eine Vermehrung in der Gewebekultur nur bei hochgradig eiadaptierten Virusstämmen möglich ist. Wie aus den Berichten in der Literatur hervorgeht, scheint das IB-Virus sich am besten in embryonalen Hühnernierenzellen zu vermehren. (Chomiak et al., 1958; Pette, 1960; Mohanty et al., 1963; Cunningham u. Spring, 1965; von Bülow, 1966). In embryonalen Hühnerfibroblasten zeigte der Virusstamm "Beaudette" erst nach einigen Gewebekulturpassagen in embryonierten Hühnernierenzellen einen charakteristischen cytopathischen Effekt (Chomiak et al., 1958; Mohanty et al., 1963). Pette konnte dagegen den Virusstamm "Beaudette" nach der ersten Eipassage auf embryonale Hühnerfibroblasten übertragen. Über ähnliche Ergebnisse berichtet von Bülow (1966). Der Virusstamm "Beaudette" ließ sich auch in permanenten Affen-

nierenzellen, nicht dagegen in Mäuseleberzellen zur Vermehrung bringen (Fahey u. Crawley, 1956). Nach den Untersuchungen von Luckert (1965) sind auch Hühnerleberzellen zur Züchtung des IB-Virus geeignet.

Über die Empfindlichkeit von verschiedenen Zellsystemen wurde von einigen Autoren berichtet. Nach Angaben von Kawamura et al. (1961) lag der Infektiositätstiter des IB-Virus in embryonalen Hühnernierenzellen so hoch wie nach der Vermehrung des Virus im bebrüteten Hühnerei. Andererseits zeigte Luckert (1965), daß der Infektiositätstiter des Virus sowohl in embryonierten Hühnernierenzellen als auch in Hühnerleberzellen niedriger als im bebrüteten Hühnerei war. Für die Züchtung des Virus sind embryonale Hühnernierenzellen nach Cunningham und Spring (1965) sowie von Bülow (1966) empfindlicher als embryonale Hühnerfibroblasten.

Als ein Merkmal einer gelungenen Viruszüchtung in der Gewebekultur gilt allgemein der cytopathische Effekt. Embryonale Hühnernierenzellen sowie Hühnerleberzellen scheinen jedoch auch für den Plaquetest geeignet zu sein (Wright u. Sagik, 1958; Cunningham u. Spring, 1965; Luckert, 1966). Ob das für alle Virusstämme zutrifft, kann bis jetzt noch nicht gesagt werden.

Über den Vermehrungsverlauf des IB-Virus (Stamm "Beau-dette") liegen einige z.T. unterschiedliche Versuchsergebnisse vor. So konnten Chomiak et al. (1958) zeigen, daß nach Verimpfung des IB-Virus auf embryonale Hühnernierenzellen erst nach 16 Stunden post infectionem (p.i.) neugebildetes Virus in dem die Zellen umgebenden Medium nachgewiesen werden kann. Der Infektiositätstiter erreichte in diesen Versuchen 48 Stunden p.i. ein Maximum und blieb danach 24 Stunden konstant. Dann folgte allmählich eine Abnahme der Infektiosität. Pette (1960) führte ähnliche Versuche in embryonalen Hühnernierenzellen und embryonalen Hühnerfibroblasten durch. In diesen Zellsystemen konnte bereits 2 Stunden p.i. eine geringe Virusmenge im Medium nachgewiesen werden. Ein Maximum der Virusvermehrung wurde in embryonalen Hühnerfibroblasten nach 20 - 22 Stunden p.i., bei embryonalen Hühnernierenzellen nach 18 - 26 Stunden p.i. erreicht. Es ist bemerkenswert, daß in diesen Versuchen der Infektiositätstiter in embryonalen Hühnernierenzellen niedriger war als in embryonalen Hühnerfibroblasten. Nach den Untersuchungen von Luckert (1965) soll die Eklipse-Phase des IB-Virus in embryonalen Hühnernieren- und Hühnerleberzellen etwa 6 - 7 Stunden dauern. In embryonalen Hühnernierenzellen wurde nach 24 Stunden p.i., in Hühnerleberzellen nach etwa 48 Stunden p.i. der optimale Infektiositätstiter erreicht.

Die Vermehrung des Virusstammes "Massachusetts" untersuchte von Bülow (1966) in embryonalen Hühnernierenzellen. Wie aus diesen Untersuchungen hervorgeht, verhält sich dieser Virusstamm ähnlich wie der "Beaudette"-Stamm.

Untersuchungen über die Thermostabilität des IB-Virus ergaben, daß ein eiadaptiertes Virus aus zwei Populationen besteht: eine thermolabile derivative (D)-Phase, die in ein paar Minuten bei 56° C inaktiviert wird und eine thermostabile originale (O)-Phase (Singh, 1960). Danach werden Untersuchungen von Cunningham (1960) verständlich, der fand, daß IB-Virus aus niedrigen Eipassagen bei 56° C erst nach 30 - 150 Minuten, hoch eiadaptiertes Virus jedoch bereits nach ein paar Minuten inaktiviert wird. Die originale (O)-Phase ist pathogen für Küken.

Für die Diagnose der infektiösen Bronchitis wurden bisher verschiedene serologische Methoden angewandt, von denen der Neutralisations- und der Agar-Gel-Präzipitationstest von Bedeutung sind. Die Neutralisationsversuche werden im allgemeinen in bebrüteten Hühnereiern durchgeführt (Jungherr u. Terrell, 1948; Fabricant, 1951; Cunningham, 1951; Page u. Cunningham, 1962; Crawley, 1953; Van Roekel et al., 1951; Van Roekel, 1955; Hitchner, 1964; Winterfield u. Hitchner, 1962; Raggi, 1960). Darüber hinaus eignet sich jedoch auch die Gewebekultur für diesen Test.

Chomiak et al. (1958) führten den Neutralisationstest nach der Virusverdünnungsmethode sowohl in bebrüteten Hühnereiern als auch in embryonalen Nierenkulturen durch. Sie fanden, daß im Gewebekultursystem der zelladaptierte Virusstamm "Beaudette" durch Antiseren gegen die Stämme "Massachusetts" und "Connecticut" neutralisiert wurde. In bebrüteten Hühnereiern wurde das gleiche Virus nur vom "Massachusetts"-Antiserum neutralisiert.

Pette (1960) arbeitete mit der Serumverdünnungsmethode in embryonalen Hühnerfibroblasten und im bebrüteten Hühnerei. Auch er zeigte, daß im Gewebekultursystem ein breiteres Antigenspektrum erfaßt werden kann als im bebrüteten Hühnerei.

Neutralisationsversuche in embryonalen Hühnernierenkulturen bei verschiedenen Temperaturen wurden von Cunningham und Spring (1965) durchgeführt. Die Untersuchungsergebnisse ergaben, daß die Neutralisierbarkeit des Virus bei 37°C höher liegt als bei 4°C . Page und Cunningham zeigten, daß der Abfall der Neutralisationskurve direkt von der Temperatur abhängig ist. Sie fanden, daß die optimale Neutralisationsrate im Reaktionsgemisch nach 5 - 10 Minuten bei 37°C , 20 Minuten bei 25°C und 25 Minuten bei 4°C erreicht wird.

Die exaktesten, bis jetzt vorliegenden Daten über die Neutralisation des IB-Virus wurden von v. Bülow (1967) geliefert, der mit verschiedenen Serotypen des IB-Virus im bebrüteten Hühnerei und in embryonalen Hühnernierenkulturen arbeitete. In den Versuchen wurde sowohl die Serum- als auch die Virusverdünnungsmethode angewandt. Dabei zeigten sich variable, lineare Beziehungen zwischen Test-Virusdosis und Serumtiter. Die Neigung der Neutralisationsgeraden war von der Virusvirulenz und der Empfänglichkeit des Wirtszellsystems, nicht aber von Eigenschaften des Immunserums abhängig. Die Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der Neutralisationsteste war bei Verwendung embryonierter Eier etwa ebenso gut wie bei embryonalen Hühnernierenkulturen.

Der Agar-Gel-Präzipitationstest wurde von Woernle (1959) zur Diagnose der infektiösen Bronchitis eingeführt. Mit seiner Hilfe können präzipitierende Antikörper im Serum erkrankter Hühner nachgewiesen werden. Darüber hinaus eignet sich der Test jedoch auch zur Identifizierung von IB-Virusstämmen. Woernle stellte fest, daß die Eiflüssigkeit oder die Gewebekulturflüssigkeit wegen ihres niedrigen Antigengehaltes als Testantigene ungeeignet sind. Er verwendete als Testantigene daher Homogenate von Chorionallantoismembranen infizierter Hühnereier. Bauditz (1963) schlug für die Diagnose der infektiösen Bronchitis das

Mikro-Präzipitationsverfahren vor. Er fand, daß diese Methode empfindlicher und schneller als die von Woernle beschriebene arbeitet.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Virus

Als Testvirus wurde in den Versuchen der IB-Virusstamm "Beaudette" verwendet, der uns freundlicherweise von Herrn Dr. von Bülow in der 4. Eipassage überlassen wurde.

Die Viruszüchtung erfolgte in 10 Tage lang bebrüteten Hühnereiern nach Infektion von etwa 10^3 plaquebildenden Einheiten (PBE)/ml virushaltiger Allantoisflüssigkeit in die Allantoishöhle. Nach einer 21 - 22stündigen Bebrütung bei 37° C wurden die infizierten Eier kurz vor dem Absterben des Embryos für etwa 12 - 16 Stunden in den Kühlraum gebracht. Nach dem Ernten der Amnion- und Allantoisflüssigkeiten wurden diese bis zum Gebrauch bei -70° C in Mengen von 1 ml aufbewahrt.

2. Bestimmung der Infektiosität im bebrüteten Hühnerei

Zur Bestimmung der Infektiosität wurde das virushaltige Ausgangsmaterial in 10-er Potenzen verdünnt und pro Verdün-

nungsstufe 5 Eier (10 Tage vorbebrütet) mit jeweils 0,2 ml beimpft. Die ID₅₀ der virushaltigen Eiflüssigkeit wurde nach der Methode von Reed und Muench (1938) bestimmt.

3. Antigennachweis mit fluoreszierenden Antikörpern

Die Globuline wurden aus Hühnerimmunsereen durch Halbsättigung mit Ammoniumsulfat in der Kälte ausgefällt, das Sediment in Aqua. dest. aufgenommen und 48 Stunden gegen Carbonatpuffer, pH 9,0, bei 4° C dialysiert. Der Proteingehalt der dialysierten Globulinlösung wurde mit Fluoresceiniso-thiocyanat unter ständigem Rühren in der Kälte gemischt und anschließend im Kühlraum etwa 20 Stunden lang mit Hilfe eines Magnetrührers gerührt. Das Farbstoff-Protein-Verhältnis betrug 1 : 75. Der ungebundene Farbstoff wurde durch Sephadex G-25 entfernt: Sephadex wurde in 0,01 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,2, gequollen, das Gel zu einer Säule gegossen und mit dem gleichen Puffer equilibriert. Das im Ausschlußvolumen durchlaufende konjugierte Protein wurde zur Entfernung der unspezifisch färbenden Komponenten über DEAE-Zellulose weitergereinigt: Die mit 0,01 M Phosphatpuffer equilibrierte Zellulose-Säule wurde mit dem Konjugat beschickt und zunächst mit Startpuffer gewaschen. Anschließend wurde mit einem 0,3 M NaCl enthaltenden Phosphatpuffer von pH 7,2 eluiert. Das auf diese Weise gewonnene Konjugat wurde in der Druckdialyse auf mindestens das Ur-

sprungsvolumen konzentriert und zur Färbung benutzt. Für längere Aufbewahrung wurden Mengen von etwa 2 ml bei -20°C eingefroren.

Die auf einem Objektträger gewachsenen embryonalen Hühnernierenzellen und embryonalen Hühnerfibroblasten wurden mit IB-Virus infiziert und nach einer Adsorption von 45 Minuten bei 37°C mit Medium überschichtet. Zu den gewünschten Zeiten post infektionem (p.i.) wurden die Proben entnommen, dreimal mit PBS gewaschen und luftgetrocknet. Anschließend wurden die Objektträger bei Raumtemperatur mit wasserfreiem Aceton 3 - 5 Minuten fixiert, einmal mit Phosphatpuffer gewaschen und luftgetrocknet. Zum Färben wurde ein Tropfen Konjugat auf die Zelle gebracht. Danach wurden die Präparate 2 Stunden in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert und anschließend mit Phosphatpuffer sorgfältig gewaschen. Sie wurden dann an der Luft getrocknet und mit einem Tropfen phosphatgepufferten neutralen Glycerin eingebettet.

Für die Fluoreszenzmikroskopie verwendeten wir das Mikroskop "Ortholux" der Firma Leitz, das mit einem Osram HB-200 UV-Brenner ausgestattet ist. In der Regel wurde der normale Hellfeldkondensor verwendet, aber auch eine Kombination einer Phasenkontrasteinrichtung mit einem blauen Filter war in manchen Fällen sehr nützlich.

4. Agar-Gel-Mikropräzipitationstest

Wir verwendeten den von Bauditz (1963) für die Diagnose der infektiösen Bronchitis beschriebenen Agar-Gel-Mikropräzipitationstest nach Mansi (1958). Für die Herstellung des Agars wurden 2 g Agar (Difco Laboratories, Detroit, USA) in 98 ml einer 8%igen Kochsalzlösung gelöst. Es folgte eine 1 1/2-stündige Erhitzung der Suspension im kochenden Wasserbad. Anschließend wurde die heiße Agarlösung zur Beseitigung von ungelösten Bestandteilen 3 - 5 Minuten bei 3000 UpM zentrifugiert, der Agar mit 1 n NaOH auf pH 7,2 eingestellt und 20 Minuten im Dampftopf sterilisiert. Die waagrecht liegenden fettfreien Glasplatten (5 x 5 cm) wurden mit einer Pipette mit jeweils 7 ml Agar bedeckt. Nach dem Erstarren des Agars wurden die Löcher mit Hilfe eines an einem Ende geschliffenen Edelstahlrohres gestanzt. In jedes Loch wurde ein Tropfen erhitzter Agar gegeben. Damit wurde der Spalt zwischen Agar und Glasboden abgedichtet. Die gleichmäßige Anordnung der Stanzlöcher wurde durch Zuhilfenahme einer gezeichneten Unterlage erzielt. Die Stanzlöcher hatten einen Abstand von 2 mm bei einem Durchmesser von 7 mm. Nach der Herstellung der Stanzlöcher wurden diese mit den Seren und Antigenen beschickt, bis die Oberfläche des Testmaterials mit der sie umgebenden Agaroberfläche eine Ebene bildete. Anschließend wurden die Platten in einer feuchten Kammer bei Zimmertemperatur gehalten.

Das Ablesen der Reaktion erfolgte über einer indirekten Lichtquelle in dem Zeitraum von 4 - 5 Stunden bis höchstens 48 Stunden nach Ansetzen des Versuches. Die Präzipitationsreaktion wurde wie folgt beurteilt:

- negativ
- + sichtbare Reaktion
- ++ deutlich sichtbare Reaktion
- +++ starke Präzipitation

5. Neutralisationstest

Der Neutralisationstest wurde nach der Serumverdünnungsmethode durchgeführt. Die im Versuch verwendeten Seren wurden vorher 30 Minuten bei 56⁰ C im Wasserbad inaktiviert. Vor den Hauptversuchen prüften wir in Vorversuchen verschiedene Inkubationszeiten, um Aufschluß über optimale Reaktionsbedingungen für die in vitro Neutralisation zu erhalten.

Das Testvirus wurde auf etwa 100 PBE eingestellt und mit den Serumverdünnungen im Verhältnis 1 + 1 (0,5 ml Virus + 0,5 ml Serum) zusammengebracht. Die Neutralisationsgemische wurden 4 Stunden lang bei 22⁰ C im Wasserbad gehalten. Zwecks Beseitigung der maternalen Antikörper wurden die Zellen vor der Inokulation einmal mit angewärmtem Phosphatpuffer gewaschen. Danach wurden für jede Probe 2 Gewebe-

kulturschälchen infiziert. Nach einer Adsorptionszeit von 45 Minuten wurden die Zellen mit agarhaltigem Medium überschichtet. Als Kontrollen dienten Virus mit Phosphatpuffer und Virus mit Normalserum. Die Plaques wurden nach 3 Tagen ausgezählt.

6. Seren

In den Untersuchungen wurden neben den Immunseren, die uns Herr Dr. Woernle freundlicherweise zur Verfügung stellte, die im Institut hergestellten Immunseren verwendet. Die Hyperimmunseren wurden auf folgende Weise gewonnen: Konzentrierte, durch fraktionierte Zentrifugation, partiell gereinigte Viruspräparationen wurden mit gleichen Volumen inkompletem Freund'schen Adjuvans versetzt und homogenisiert. Danach wurde diese Emulsion in einer Woche Abstand dreimal intramuskulär appliziert. 10 - 14 Tage nach der dritten Impfung wurde Blut entnommen und geprüft. Die positiven Seren wurden bei -20° C aufbewahrt.

7. Gewebekulturen

Alle Versuche wurden in Primärkulturen durchgeführt.

Embryonale Hühnerfibroblasten: 11 Tage alte Embryonen wurden dekapitiert, die Eingeweide entfernt und zweimal mit GKN-Lösung gewaschen. Die in einem Kolben gesammelten Gewebestücke wurden bei Zimmertemperatur 15 Minuten lang

mit 0,2%iger Trypsinlösung behandelt. Die abgelösten Zellen wurden durch Gaze filtriert und anschließend 5 Minuten bei 1300 UpM zentrifugiert. Das Zellsediment wurde mit GKN-Lösung gewaschen und wieder zentrifugiert. Das so erhaltene Sediment wurde mit Anzuchtmedium so verdünnt, daß die Zellzahl 2×10^6 /ml betrug. Vier ml dieser Zellsuspension wurden schließlich auf Petrischalen (Durchmesser: 5 cm) ausgesät. Der Zellrasen war stets nach 24 Stunden komplett ausgewachsen.

Embryonale Hühnernierenzellen: Im Prinzip wurden Kulturen aus embryonalen Hühnernierenzellen in gleicher Weise wie die Fibroblastenkulturen angelegt. Die Nieren aus 18 - 20 Tage alten Embryonen wurden aseptisch entnommen und dann mit kalter Phosphatpufferlösung gewaschen. Anschließend wurden die Nieren mit der Schere zerkleinert und 15 Minuten mit 0,2%iger Trypsinlösung bei Raumtemperatur behandelt. Die abgedauten Zellen wurden bei 1300 UpM zentrifugiert und dreimal mit Phosphatpufferlösung gewaschen. Die Zellzahl wurde auf 3×10^6 /ml durch Verdünnung des Sediments im Anzuchtmedium eingestellt und auf jede Petrischale 4 ml ausgesät. Die Zellrasen waren nach 2 - 3 Tagen geschlossen.

Embryonale Hühnerlungenzellen: Die Lungenzellen wurden aus 16 - 18 Tage alten Hühnerembryonen gewonnen und den

Nierenkulturen entsprechend behandelt. Nach 2 - 3 Tagen waren die Zellrasen geschlossen.

8. Kulturmedien und Lösungen

a) Anzuchtmedien

Für embryonale Fibroblasten wurde ein Kulturmedium bestehend aus Lactalbuminhydrolysat und Vitaminen (Lavit) im Earle'schen Kulturmedium verwendet. Das Medium enthält zusätzlich 10% Kälberserum.

Die embryonalen Hühnernieren- und Hühnerlungenzellen wurden in einem von Eagle (1959) entwickelten Kulturmedium gezüchtet, welches sich in modifizierter Form (vergl. Bablanian, Eggers u. Tamm, 1965) wie folgt zusammensetzt: 75% Eagle's Kulturmedium, 20% Kälberserum und 5% Tryptose-Phosphatlösung.

b) Vermehrungsmedium

Für den Plaquetest wurde das von Babiker und Rott (1968) entwickelte agarhaltige Medium verwendet:

Medium 199 (2x) mit NaHCO_3	485,0 ml
L-Glutamin (3%ig)	10,0 "
Rinderserumalbumin (20%ig)	5,0 "
Kanamycin	0,1 "
Moronal	0,15 "
gereinigter Difco-Agar (1,4%ig)	500,0 "

Für die Vermehrungsversuche wurde ein Medium gewählt, das in seiner Zusammensetzung dem agarhaltigen Medium entsprach, jedoch anstelle des Agars Aqua bidest. enthielt.

c) Weitere Lösungen

NaCl-Phosphatpuffer, pH 7,2, nach Sörensen wurde zum Verdünnen des Virus gebraucht.

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung: Zur Vorbereitung der Zellkulturen wurde die Salzlösung nach Moscana (1952) verwendet, die von Calcium- und Magnesiumionen frei ist.

Glucose-Kalium-Kochsalzlösung (GKN), die folgende Zusammensetzung hat, wurde zum Waschen bestimmter Zellkulturen verwendet:

Glucose	10,0 g
NaCl	80,0 g
KCl	4,0 g
KH_2PO_4	6,0 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,6 g
Phenolrot	0,8 g
Aqua bidest ad	1000,0 ml

Diese Lösung diente als Stammlösung und wurde vor Gebrauch 1 : 10 mit Aqua bidest verdünnt.

DEAE-Dextran (Molekulargewicht = 5×10^5) wurde als Trockenpulver von der Firma Pharmacia, Uppsala, Schweden, bezogen. Es wurde in phosphatgepufferter Lösung in Mengen von 10 mg/ml gelöst.

Serumalbumin wurde als Trockenpulver von den Behringwerken AG, Marburg, erhalten und in sterilem Aqua bidest gelöst.

Haemaccel wurde als 3,5%ige Lösung von den Behringwerken AG, Marburg, bezogen.

Tryptosephosphat (Difco Laboratories, Detroit, USA) wurde als 2,95%ige Lösung in Aqua bidest verwendet.

IV. UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE

1. Entwicklung eines Plaquetestes zur Bestimmung der Infektiosität des Virus der infektiösen Bronchitis der Hühner

Wie bereits erwähnt, eignet sich für die Züchtung des Virus der infektiösen Bronchitis der Hühner (IBV) der zehntägige Hühnerembryo sehr gut. Zudem ruft eine Infektion eine Verzweigung des Embryos hervor, so daß dieses Phänomen zur quantitativen Bestimmung der Infektiosität von Virusauspräparaten verwendet werden kann. Virusauspräparate, die durch Geflügel auf Gepadiviriose positiv sind, wurden mit dem Plaquetest durchgeföhrt. Cunningham et al. (1965) sowie Luckert (1965) hatten bereits früher mit an Gewebekultur adaptiertem IB-Virus in Linschlichtzer-Kulturen von Hühnerembryonen (Hühnerembryonieren- und Hühnerembryo-lecithellen) einen solchen Plaquetest entwickelt. Für die Praxis ist es jedoch wünschenswert, solche quantitativen Bestimmungen auch mit Viren durchföhren zu können, welche nicht zuvor auf dem entsprechenden Gewebe adaptiert worden mußten. (Dies gelang Wright und Sagik (1958), die gleichfalls mit Hühnerembryonierengewebe Plaquetests durchführten.) Allerdings ist die Lebensfähigkeit von Hühnerembryonierengewebe relativ labil und zudem die Herstellung dieser Gewebekultur kostspielig und aufwendig. Es lag

her in unserem Interesse, weitere Gewebe und Kulturbedingungen zu eruieren, um nicht gewebeadaptiertes IB-Virus quantitativ zu bestimmen.

Es war naheliegend, hierfür embryonale Hühnerfibroblasten zu benutzen, nachdem sich bereits zeigte, daß diese Zellen nach Infektionen mit IB-Virus cytopathisch verändert werden. Die Zellen wurden nach der im Institut üblichen Methode (siehe Material und Methoden) aus 11 Tage alten Hühnerembryonen isoliert und in Petrischalen von 5 cm Durchmesser gegossen. Ein Tag nach Ansatz der Zellkultur war der Zellrasen komplett ausgewachsen und konnte mit Virusverdünnungen infiziert werden. Nach einer zunächst nur willkürlich gewählten Adsorptionszeit von 60 Minuten wurden die infizierten Zellen gewaschen und mit dem von Dulbecco und Vogt (1954) beschriebenen oder mit dem von Babiker und Rott (1968) entwickelten agarhaltigen Medium überschichtet. Drei Tage später wurden die Zellen mit 1%iger Neutralrotlösung oder mit einem neutralrothaltigen Agar gefärbt.

Plaques konnten in embryonalen Hühnerfibroblasten nur dann nachgewiesen werden, wenn das von Babiker und Rott (1968) bei Influenzaviren benutzte agarhaltige Überschichtungsmedium und zur Färbung neutralrothaltiger Agar benutzt wurde. Das bedeutet, daß das IB-Virus an die Zell-

kulturen relativ hohe Ansprüche stellt und macht verständlich, warum embryonale Hühnerfibroblasten bisher als nicht geeignet für den Plaquetest beschrieben wurden.

Die durch das IB-Virus in Hühnerfibroblasten gebildeten Plaques haben grundsätzlich das gleiche Aussehen. Sie sind klar, rund und nicht sehr scharf begrenzt (siehe Abb. 1).

2. Bestimmung der genauen Bedingungen für den Plaquetest

Nachdem es grundsätzlich möglich war, durch das IB-Virus in embryonalen Hühnerfibroblasten Plaques zu erzeugen, sollten im folgenden die optimalen Bedingungen für einen sensitiven Plaquetest ausgearbeitet werden.

a) Bestimmung der optimalen Virusadsorptionszeit

Um für unser System die optimale Adsorptionszeit und damit die höchste Infektionswahrscheinlichkeit zu bestimmen, wurde in den folgenden Versuchen dem Virus nach der Infektion verschieden lange Zeit Gelegenheit gegeben, sich an die Kulturzellen zu adsorbieren. Erst danach wurden die Zellen mit agarhaltigem Medium überschichtet. Pro Verdünnungsstufe verwendeten wir 5 Platten.

Wie Tabelle 1 zeigt, wird das IB-Virus sehr rasch an die Zellen adsorbiert, da bei einer Adsorptionszeit zwi-

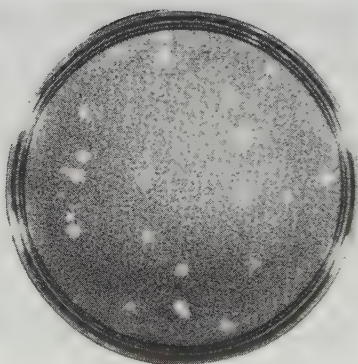


Abb. 1 Plaques des IB-Virus in embryonalen Hühnerfibroblasten

Tabelle 1

Versuche zur Bestimmung der optimalen Adsorptionszeit

Adsorptionszeit in Minuten	PBE/ml
30	$1,5 \times 10^5$
45	$1,0 \times 10^5$
60	$2,0 \times 10^5$
90	$3,0 \times 10^5$
120	$2,0 \times 10^5$

schen 30 und 120 Minuten kein signifikanter Titeranstieg festgestellt werden konnte. Eine Überprüfung mit kürzeren Adsorptionszeiten (Tab. 2) bestätigte diesen Befund. Bereits nach einer Adsorption von 5 Minuten läßt sich eine Plaquezahl bestimmen, die durch längere Inkubation nicht wesentlich gesteigert wird. In allen folgenden Versuchen wurde aus Gründen eines normierten Arbeitsablaufes eine gleichbleibende Adsorptionszeit von 45 Minuten gewählt.

b) Einfluß der Inkubationszeit auf die Plaquezahl

Erfahrungsgemäß ist eine Viruspopulation genetisch nicht einheitlich, was u.a. auch in einer unterschiedlichen Entwicklungszeit von lokalen Läsionen (Größe der Plaques) zum Ausdruck kommt. Um möglichst alle infektiösen Viruspartikel zu erfassen, wurden die infizierten Zellen daher verschieden lange Zeit vor der Färbung bei 37° C im CO₂-durchströmten Brutschrank inkubiert. Die Versuche ergaben, daß bereits 48 Stunden p.i. eine optimale Plaquezahl erfaßt werden konnte. Die Plaques werden jedoch mit zunehmender Inkubationszeit größer und können so auch besser dargestellt und somit besser gezählt werden. Das geht aus Abb. 2 hervor, bei der die Plaques mit maximalem und minimalem Durchmesser in Abhängigkeit von der Inkubationszeit aufgetragen wurden. Eine Inkubationszeit von 72 Stunden erschien uns für die folgenden Versuche am zweckmäßigsten.

Tabelle 2

Versuche zur Bestimmung der optimalen Adsorptionszeit

Adsorptionszeit in Minuten	PBE/ml
5	$2,6 \times 10^5$
10	$1,0 \times 10^5$
20	$4,16 \times 10^5$
30	$2,83 \times 10^5$
45	$3,5 \times 10^5$

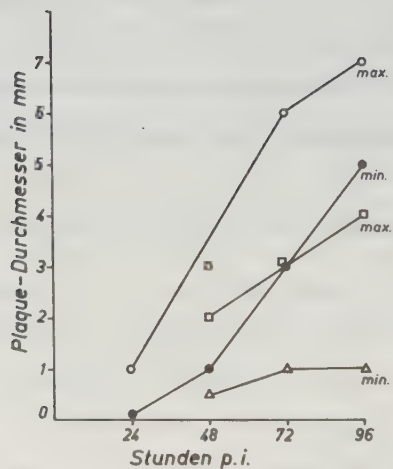


Abb. 2 Größe der Plaques des IB-Virus
nach verschiedenen Inkubations-
zeiten

- Hühnernierenzellen
- Hühnernierenzellen
- embryonale Hühnerfibroblasten
- △ embryonale Hühnerfibroblasten

c) Bestimmung der optimalen Färbedauer

Da der im agarhaltigen Medium enthaltene Farbstoff je nach Versuchsbedingung eine unterschiedliche Diffusionszeit beansprucht, mußte in unserem System die optimale Färbedauer ermittelt werden. Entsprechende Versuche ergaben, daß die Färbedauer zumindest 4 Stunden betragen muß, damit sich die Plaques eindeutig identifizieren ließen. Wir benutzten jedoch aus Sicherheitsgründen regelmäßig eine 6-stündige Färbezeit.

d) Einfluß eines polysaccharidartigen Inhibitors auf die Plaquebildung

Da im Agar enthaltene schwefelhaltige Polysaccharide Vermehrung und Plaquegröße bei verschiedenen Virusarten beeinflussen (Liebhaber u. Takemoto, 1961), wurde in einem Versuch zum Überschichtungsmedium DEAE-Dextran in einer Konzentration von 100 µg/ml zugegeben. DEAE-Dextran - ein polybasisches, wasserlösliches Makromolekül, mit einem Molekulargewicht von 5×10^5 - bindet die im Agar enthaltenen Polysaccharide und neutralisiert auf diese Weise den Inhibitor (Takemoto u. Liebhaber, 1961).

Es wurde gefunden, daß bei der verwendeten Konzentration von DEAE-Dextran die Plaquesdurchmesser bei annähernd gleichbleibender Zahl um etwa das Zweifache zunahmen. Die

Plaqueform wurde durch diese Behandlung nicht verändert. Die Befunde besagen, daß im verwendeten Agar ein polysaccharidhaltiger Inhibitor vorhanden ist, der die Plaque-durchmesser beeinflußt und der durch DEAE-Dextran neutralisiert werden kann. Für Routineuntersuchungen braucht DEAE-Dextran jedoch nicht verwendet zu werden, da die Plaquezahl durch den Inhibitor nicht wesentlich beeinflußt wird.

e) Beziehung zwischen Virusverdünnung und Plaquezahl

Wie Abb. 3 zeigt, nimmt die Anzahl der Plaques annähernd proportional mit der Virusverdünnung ab. Eine Linearität ist nur bei höheren Virusverdünnungen feststellbar. Abweichungen bei höheren Viruskonzentrationen sind sicherlich auf eine Aggregation der Viruspartikel zurückzuführen. Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß jeweils ein Plaque durch nur ein infektiöses Viruspartikel hervorgerufen wird.

f) Effekt der Inkubationstemperatur auf die Plaquebildung

Bekanntlich wird die Plaquebildung auch durch die während der Inkubationszeit verwendete Temperatur beeinflußt. Es war interessant festzustellen, daß schon eine Verminderung der Bebrütungstemperatur von 37° auf 35° C eine

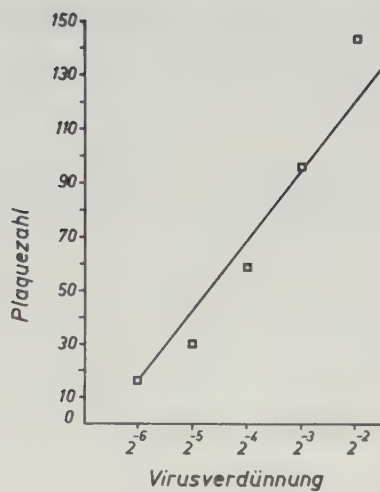


Abb. 3 Beziehung zwischen Virusverdünnung und Plaquezahl beim IB-Virus-Hühnerfibroblastensystem

Plaquebildung des IB-Virus innerhalb von 96 Stunden p.i. vollständig verhinderte. Auf der anderen Seite ergab eine Temperatursteigerung von 37° C auf 40° C keine signifikante Änderung der Plaquezahl und -größe (siehe Tab. 3). Die empirisch gewählte Inkubationstemperatur konnte damit experimentell verifiziert werden.

2. Vergleichende Titration der Infektiosität im Hühner-embryo und im Plaquetest

Um die Empfindlichkeit des Plaquetests von nicht Gewebekultur-adaptiertem IB-Virus gegenüber der Bestimmung der Infektiosität im bebrüteten Hühnerei zu prüfen, wurden vergleichende Untersuchungen durchgeführt. Die Tests wurden mit dem gleichen Virusmaterial und zur gleichen Zeit vorgenommen. Wie Tab. 4 zeigt, lassen sich zwischen der Bestimmung der ID₅₀ im Hühnerei und dem Plaquetest in embryonalen Hühnerfibroblasten keine nennenswerten Abweichungen feststellen. Das bedeutet, daß der von uns entwickelte Plaquetest mit embryonalen Hühnerfibroblasten in seiner Empfindlichkeit an die übliche Bestimmung im embryonierten Hühnerei heranreicht. Überlegen wird der Plaquetest jedoch, wenn anstelle von embryonalen Hühnerfibroblasten Hühnernierenzellen verwendet werden. Hier steigt die erfaßte Infektiosität um den Faktor 10 an. Zur Bestimmung niederer Viruskonzentrationen sollten daher Hühnernieren-

Tabelle 3

Plaquetest bei verschiedenen Temperaturen

Temperatur	Zeit in Stdn. p.i.	PBE/ml	Plaquetgröße in mm min. - max.
35° C	48	-	-
	72	-	-
	96	-	-
37° C	48	1,75 x 10 ⁵	0,5 - 2,0
	72	2,5 x 10 ⁵	1,0 - 3,0
	96	1,58 x 10 ⁵	1,0 - 4,0
40° C	48	2,75 x 10 ⁵	0,5 - 2,0
	72	1,52 x 10 ⁵	1,0 - 3,0
	96	8,75 x 10 ⁴	1,0 - 4,0

Tabelle 4

Vergleichende Bestimmung der Infektiosität im bebrüteten Hühnerei und im Plaquetest

Wirtssystem	Titer/ml	
HEN-Zellen	PBE	$1,0 \times 10^7$
HEF-Zellen	PBE	$1,75 \times 10^6$
Hühnerei	ID ₅₀	$3,09 \times 10^6$

zellen verwendet werden. Worauf dieser sicherlich interessante Unterschied zwischen embryonalen Hühnerfibroblasten und Hühnernierenzellen besteht, soll anschließend noch untersucht werden.

3. Vermehrung des IB-Virus in verschiedenen Zellkulturen

Bei der Ausarbeitung der für den Plaquetest optimalen Bedingungen ist aufgefallen, daß einmal das IB-Virus bei 35° C keine Plaques in embryonalen Hühnerfibroblasten zu bilden vermag und daß zum anderen Hühnernierenzellen in ihrer Sensitivität den embryonalen Hühnerfibroblasten überlegen waren. Es lag daher in unserem Interesse zu versuchen, die Ursachen dieser Befunde aufzuklären. Zu diesem Zweck sollten die zeitlichen und quantitativen Verhältnisse während der Virusvermehrung in Gewebekulturen verfolgt werden.

Die verwendeten Zellsysteme (einschichtige Kulturen von embryonalen Hühnerfibroblasten, Hühnernierenzellen bzw. Hühnerlungenzellen) wurden mit einer Multiplizität (PBE pro Zelle) zwischen 10 und 50 infiziert, um möglichst alle Zellen mit Viruspartikeln in Kontakt zu bringen und somit eine synchrone Vermehrung anzustreben. Nach einer Adsorption von 45 Minuten wurden die infizierten Zellen dreimal mit PBS gewaschen, anschließend mit 2 ml flüssigem Vermehrungsmedium überschichtet und dann bei 37° C im CO₂-durchspülten Brutschrank gehalten. In vorwiegend einstündigen

Intervallen wurden jeweils 2 Gewebekulturplatten entnommen, das Medium (zellfreies Virus) abgesaugt und bei 4° C bis zur Bestimmung der Infektiosität aufbewahrt. Die infizierten Zellen (zellassoziertes Virus) wurden bei -70° C eingefroren, vor den quantitativen Bestimmungen mit Gummischabern abgeschabt und in 2 ml PBS suspendiert. Die suspendierten Zellen wurden dann dreimal eingefroren (-30° C) und aufgetaut, die Zelltrümmer durch Zentrifugation (10 Min., 3000 UpM) ausgeschleudert und der Überstand bei 4° C aufbewahrt. Zur Bestimmung der Infektiosität des freigesetzten und zellassozierten Virus benutzten wir den Plaquetest in embryonalen Hühnerfibroblasten.

Die Vermehrung des IB-Virus in embryonalen Hühnerfibroblasten ist in Abb. 4 dargestellt. Daraus geht hervor, daß die Infektiositätstiter von zellassoziertem und zellfreiem Virus in den ersten Stunden nach der Infektion zuerst abfallen. Zwischen der 3. und 4. Stunde p.i. steigen sie wieder an, um nach etwa 24 - 26 Stunden p.i. ein Maximum zu erreichen. Das in Kulturmedien enthaltene, also von der Wirtszelle freigesetzte Virus und das aus den Zellen extrahierte Virus verhalten sich nahezu gleichartig. Das bedeutet, daß das neugebildete Virus sofort von den Zellen ausgeschleust wird.

In embryonalen Hühnerlungenzellen läßt sich neusynthetisiertes Virus bereits 2 - 3 Stunden nach der Infektion fest-

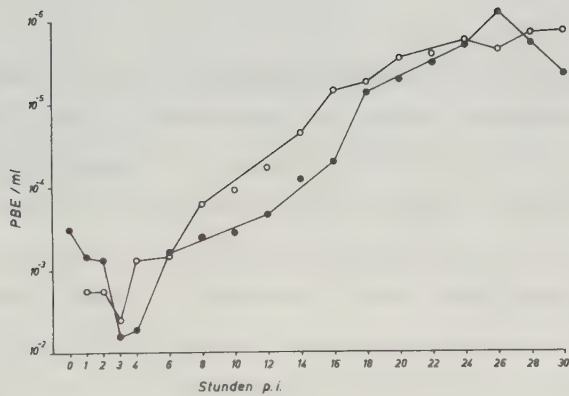


Abb. 4 Vermehrung des IB-Virus in Hühnerfibroblasten

- zellgebundenes Virus
- zellfreies Virus

stellen. Es erreicht sein Infektionsplateau schon nach 18 Stunden p.i.. Bemerkenswert ist, daß sich in diesen Wirtszellen zellgebundenes und aus den Zellen ausgeschleustes Virus in gleicher Menge nachweisen lassen (Abb. 5).

Bei Verwendung von Hühnernierenzellen kann ein Anstieg der plaquebildenden Einheiten von zellassoziertem Virus bereits zwischen der 1. und 2. Stunde p.i. nachgewiesen werden. Erst zwei Stunden später läßt sich neusynthetisiertes Virus im Kulturmedium erfassen. Der Vermehrungszyklus ist hier schon nach 12 Stunden p.i. abgeschlossen. Das von den Zellen ausgeschleuste Virus zeigt mit fortschreitender Vermehrungszeit höhere Titer als das zellgebundene Virus (Abb. 6).

Unterschiede in der Vermehrung des IB-Virus in den geprüften Zellsystemen lassen sich besonders gut veranschaulichen, wenn, wie in Abb. 7 für zellassoziertes Virus geschehen, die Vermehrungskurven zusammen dargestellt werden. Aus der Abb. 7 geht ganz deutlich hervor, daß die Eclipse-Phase in Hühnernierenzellen am kürzesten und bei embryonalen Hühnerfibroblasten am längsten ist. Analog hierzu wird das Optimum der Virusvermehrung auch bei Hühnernierenzellen am frühesten und bei embryonalen Hühnerfibroblasten am spätesten erreicht. Die Menge des neue-

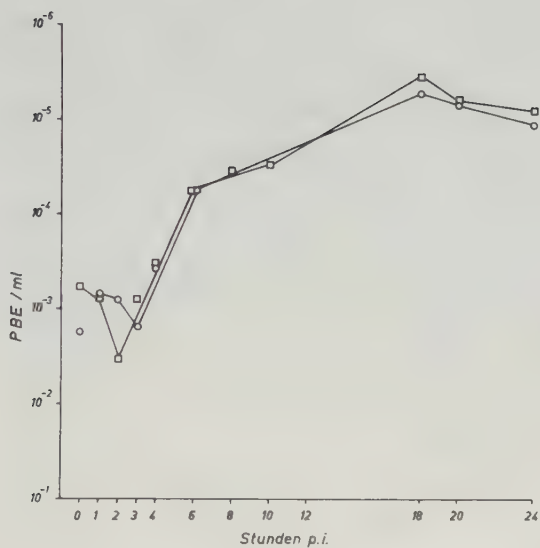


Abb. 5 Vermehrung des IB-Virus in Hühnerlungenzellen

□ zellgebundenes Virus

○ zellfreies Virus

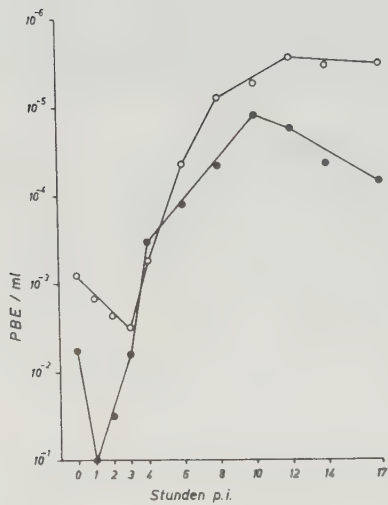


Abb. 6 Vermehrung des IB-Virus in
Hühnernierenzellen

- zellgebundenes Virus
- zellfreies Virus

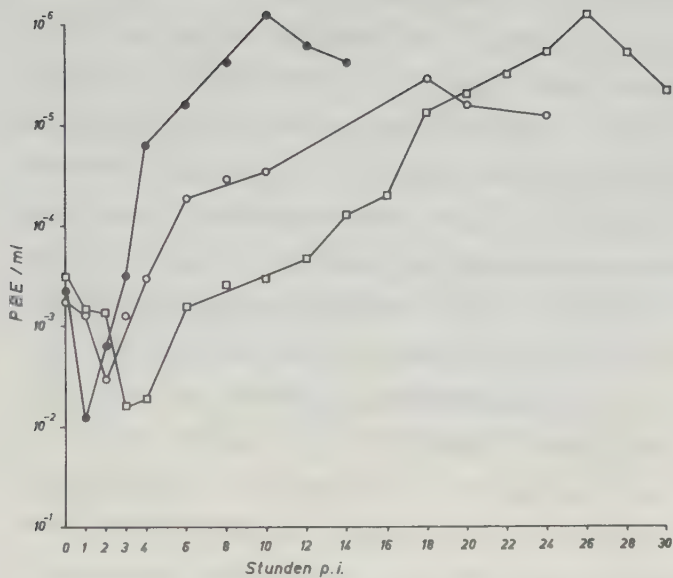


Abb. 7 Vergleich der Vermehrung in Hühnernieren- (●),
Hühnerlungenzellen (○) und Hühnerfibroblasten (□)

bildeten Virus ist schließlich in allen 3 Zellsystemen dieselbe. Zur Zeit 0 nach der Infektion beträgt die Infektiosität ungefähr 2×10^3 PBE/Kultur, die Zahl der infizierten Zellen jedoch 2×10^6 PBE/Kultur. Von den Viruspartikeln, die zur Infektion der Zellen führt, sind also nur noch geringe Spuren (0,01%) als infektiöse Partikel nachzuweisen. Aller Wahrscheinlichkeit nach beruht diese Restinfektiosität auf nicht in die Zelle eingebrungenen Viren. Da durch unser Testsystem sicherlich nicht alle infektiösen Viruspartikel erfasst werden, können qualitative Aussagen über die Anzahl der in einer Zelle gebildeten Viruspartikel nicht gemacht werden. Sie liegt aber bestimmt höher als durch die in den Abbildungen angegebenen Titer hervorgeht. Aus Abb. 8 läßt sich das Verhalten des IB-Virus in embryonalen Hühnerfibroblasten bei 35° C erkennen. Die Abbildung zeigt, daß bei einer Verminderung der Bebrütungstemperatur um 2° C innerhalb von 20 Stunden, wenn überhaupt, so nur sehr wenig Virus synthetisiert wird. Dieser Befund macht es verständlich, warum bei 35° C keine Plaques gebildet werden.

4. Untersuchungen mit fluoreszierenden Antikörpern

Auf Grund der zu Beginn der Untersuchungen in der Literatur vorliegenden Daten konnten keine eindeutigen Aussagen über den Bildungsort des IB-Virus in den Wirtszel-

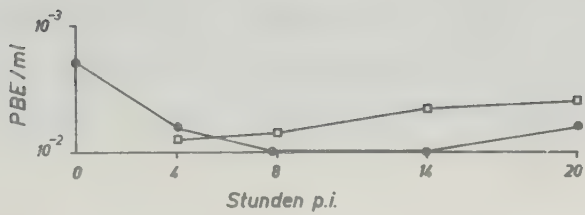


Abb. 8 Vermehrung des IB-Virus in Hühnerfibroblasten
bei 35° C

□ zellgebundenes Virus

● zellfreies Virus

len gemacht werden. So wurde von Mohanty und Mitarbeitern (1964) berichtet, daß mit fluoreszierenden Antikörpern Virusantigen 7 Stunden nach der Infektion ausschließlich im Zellkern nachzuweisen ist. Auf der anderen Seite fand von Bülow (1969) virusspezifisches Antigen während der ganzen Vermehrungsphase von der 4. Stunde p.i. an ausschließlich im Cytoplasma. Zur Klärung dieser Diskrepanz und des unterschiedlichen Verhaltens der Vermehrung des Virus in verschiedenen Zellen wurden von uns ebenfalls Untersuchungen mit fluoreszierenden Antikörpern durchgeführt. Die dabei angewendete Technik wurde im Abschnitt "Material und Methoden" beschrieben.

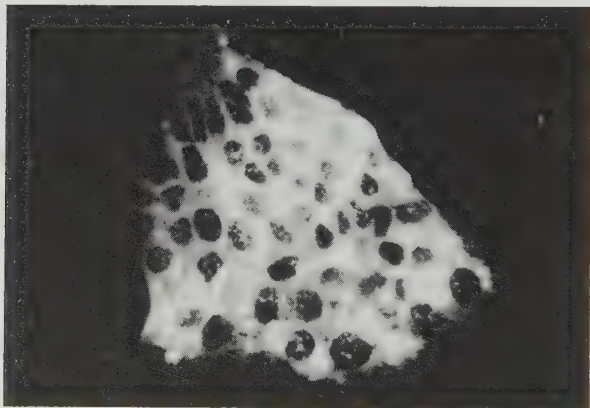
Die entsprechenden Untersuchungen ergaben, daß virus-spezifische Antigene bei Hühnerernierzellen bereits 4 Stunden p.i. in infizierten Zellen nachzuweisen sind. Zu dieser Zeit zeigen etwa 50%, nach 6 - 8 Stunden etwa 100% der Zellen eine deutliche, spezifische Fluoreszenz. Soweit sich das mit bloßem Auge feststellen läßt, erreicht die Intensität der Fluoreszenz in den Zellen 8 - 10 Stunden p.i. ihren Höhepunkt. Bei embryonalen Hühnerfibroblasten trat die Fluoreszenz später auf und war während des gesamten Vermehrungszyklus nur in etwa 25% der Zellen zu sehen. Sie ließ sich in diesem Zellsystem frühestens 10 Stunden p.i. nachweisen und erreichte ihre höchste Intensität etwa 18 - 20 Stunden p.i.. Dabei spiel-

te es keine Rolle, ob für die Untersuchungen primäre oder sekundäre Kulturen von embryonalen Hühnerfibroblasten verwendet wurden. Die Ergebnisse stimmen gut mit der Vermehrungsgeschwindigkeit des IB-Virus in den verschiedenen geprüften Zellsystemen überein. Wir hatten den Eindruck, daß das Auftreten von mit fluoreszierenden Antikörpern erfassbaren virusspezifischen Antigenen dem Erscheinen von neusynthetisiertem, infektiösen Virus etwas vorangeht. Wie die Abb. 9 zeigt, läßt sich IB-virusspezifisches Antigen in beiden geprüften Zellsystemen nur im Cytoplasma nachweisen. Dabei spielt es keine Rolle, wann die Zelle nach der Infektion angefärbt wurde.

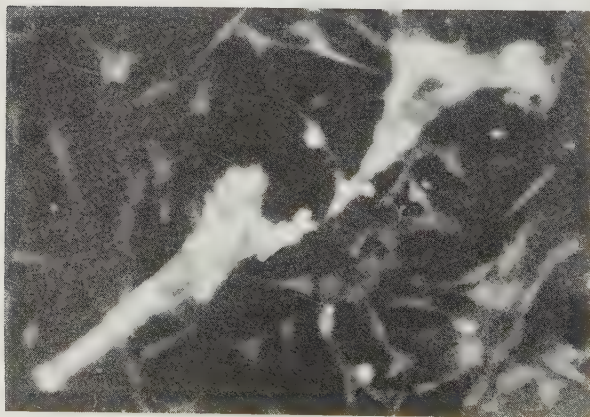
5. Reinigung eines virusspezifischen Antigens für den Agar-Gel-Präzipitationstest

Das gebräuchlichste Verfahren zur Diagnose der infektiösen Bronchitis ist der von Woernle (1959) inaugurierte Agar-Gel-Präzipitationstest nach Ouchterlony (1948). Woernle konnte zeigen, daß in Homogenaten von Chorioallantoismembranen von Hühnereiern, die mit dem IB-Virus infiziert worden waren, IB-Virusantigene vorhanden sind, die im Agar-Gel-Präzipitationstest mit spezifischen Antiseren eine Präzipitationsbande bilden. Das in den Eihauthomogenaten vorliegende Antigen ist nicht sehr stabil und hat ferner den Nachteil, daß sich um die Auftragungsstelle im-

Abb. 9 Untersuchungen mit IB-Virus-spezifischen fluores-
zierenden Antikörpern



a) Hühnernierenzellen 12 Stunden p.i.



b) Hühnerfibroblasten 18 Stunden p.i.

mer eine trübe Zone bildet, die oft ein nur schwach ausgeprägtes Präzipitat überdeckt. Um diese Nachteile auszuschalten, haben wir versucht, dieses Rohantigen partiell zu reinigen.

Für die Reinigung des Antigens wurde die von Becht (1968) für die Reinigung des RNP-Antigens der Influenzaviren beschriebene Methode angewendet. Chorioallantoismembranen aus infizierten Eiern, die innerhalb von 21 - 24 Stunden nach der Infektion abstarben, wurden dreimal in kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Membranen bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C aufbewahrt. Je nach Bedarf wurden erforderliche Mengen von Membranen aufgetaut, in PBS im Verhältnis 1 : 3 aufgenommen und 3 - 5 Minuten in der Kälte homogenisiert. Das Homogenat wurde dreimal eingefroren und aufgetaut; nach dem letzten Auftauen wurde nochmals homogenisiert. Das so erhaltene Homogenat wurde 30 Minuten lang bei 3000 UpM bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand 45 Minuten bei 20 000 UpM zentrifugiert und der so gewonnene Überstand mit Trichlorfluorethan (Frigen 113, Farbwerke Hoechst) im Verhältnis von 1 : 5 im Eisbad 5 Minuten lang geschüttelt. Die nach 20-minütiger Zentrifugation bei 3000 UpM erhaltene Wasserphase wurde mit gleichen Teilen peroxydfreiem Äther geschüttelt. Der in der nach 10 Minuten bei 3000 UpM erhaltenen Wasserphase enthaltene Äther

wurde im Stickstoffstrom entfernt. Nach einer weiteren Klärung, durch 10 Minuten lange Zentrifugation bei 30 000 UpM, wurde das im Überstand enthaltene Antigen bis zum Gebrauch bei -20° C aufbewahrt. Das Verhalten der biologischen Aktivität des Antigens wurde durch das radiale Diffusionsverfahren kontrolliert (Schwick u. Störiko, 1964). Wie aus Tab. 5 hervorgeht, sind die während der Aufarbeitung auftretenden Antigenverluste vernachlässigbar gering. Dem stand eine 40-fache Steigerung der spezifischen Aktivität gegenüber.

Im Agar-Gel-Präzipitationstest gab das Antigen bereits nach 4 Stunden eine gut erkennbare Bande. Das Antigen ließ sich ohne erkennbaren Aktivitätsverlust mehr als 8 Wochen bei 4° C aufbewahren.

6. Neutralisationstest

Nachdem es uns gelungen ist, einen relativ einfach durchführbaren und genügend sensitiven Plaquetest für das IB-Virus auszuarbeiten, sollte versucht werden, mit seiner Hilfe neutralisierende Antikörper in Hühnerseren zu erfassen. Pette (1960) sowie von Bülow (1967) haben bereits die Gewebekultur für den Neutralisationstest beim IB-Virus verwendet und gefunden, daß damit stets

Tabelle 5

Reinigung des präzipitierenden Antigens

Antigen	Protein mg/ml	Radiale Immundiffusion Durchmesser der Diffu- sionszone in mm
Homogenisat	1300	9
Überstand	507	10
Frigen- behandelt	40	9
Äther- behandelt	30	7,5

höhere Serumtitert ermittelt werden konnten als in Versuchen mit embryonierten Hühnereiern. Bei den entsprechenden Versuchen wurden sowohl von Pette (1960) als auch von v. Bülow (1967) der cytopathische Effekt als Maß für eine stattgefundene Infektion benutzt. Da der Plaque-test allgemein genauere Werte ergibt als der auf einem cytopathischen Effekt beruhende Infektiositätstest war zu erwarten, daß sich ersterer auch besser für den Neutralisationstest eignet.

Bei allen Versuchen wurde nach der Serumverdünnung gearbeitet. Pro Ansatz wurden ungefähr 100 plaquebildende Einheiten mit einer Serumverdünnung gemischt und die Mischung verschieden lange bei den in den Versuchen angegebenen Temperaturen gehalten. Anschließend gaben wir die Virus-Serum-Gemische auf die Gewebekulturen. Die Anzahl der ausgebildeten Plaques wurde 72 Stunden p.i. bestimmt.

In Vorversuchen wurde gefunden, daß eine Reduktion der Plaquezahl durch virusspezifisches Immunsérum zu erreichen ist, wenn Serum und Virus vor der Inkubation bei 22° C für 60 Minuten gehalten wurden. Wird homologes Antiserum verwendet, läßt sich in jedem Falle eine lineare Abhängigkeit zwischen der Reduktion der Plaquezahl und der Serumverdünnung feststellen (siehe Tab. 6). Das war aber nicht der Fall, wenn positive Seren von durchseuch-

Tabelle 6

Neutralisationstest mit homologem Antiserum

	Ansatz mit Antiserum						Ansatz mit Normalserum
	2 ⁻⁷	2 ⁻⁸	2 ⁻⁹	2 ⁻¹⁰	2 ⁻¹¹	2 ⁻¹²	
Serumverdünnung							
PBE/ml	0	0	4,5	9	18	35	42

seuchten Hühnerbeständen bei den Neutralisationsversuchen verwendet wurden. In diesen Fällen konnten wir sehr häufig beobachten, daß die Abnahme der Plaquezahlen nicht mit der Konzentration der Antikörper korrelierbar war. Ein typisches Beispiel wird in Tab. 7 gezeigt. Auch durch Änderung der Temperatur und der Zeit für die Inkubation der Virus-Antiserummischung konnten keine befriedigenderen Ergebnisse erhalten werden. Benutzt wurden Inkubationstemperaturen zwischen 4 und 37° C und Inkubationszeiten zwischen 1 und 24 Stunden.

Ohne Zweifel sprechen unsere Versuche dafür, daß der Neutralisationstest mit Hilfe des von uns entwickelten Plaquestes für alle IB-viruspezifischen Antiseren als qualitative Methode geeignet ist, wenn eine Reduktion der Plaquezahl von 70 - 90% zugrundegelegt wird. Hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit ist diese Methode dem allgemein angewendeten Agar-Gel-Präzipitationstest überlegen. Das geht aus Versuchen hervor, bei denen 15 verschiedene Seren, die wir aus unterschiedlichen Hühnerzuchtbetrieben gewannen, vergleichend im Neutralisationstest und der Agar-Gel-Präzipitation geprüft haben. Wie Tab. 8 ausweist, wurden in allen geprüften Rekonvaleszentenseren mit Hilfe des Neutralisationstestes Antikörper festgestellt, bei 2 Seren konnten dagegen im Agar-Gel-Präzipitationstest keine Präzipitationsbanden gefunden werden.

Tabelle 7

Neutralisationstest mit heterologem Antiserum bei verschiedenen Temperaturen

Temperatur	Serumverdünnung*										Viruskontrolle
	2 ⁻⁵	2 ⁻⁶	2 ⁻⁷	2 ⁻⁸	2 ⁻⁹	2 ⁻¹⁰	2 ⁻¹¹	2 ⁻¹²			
4° C	3	14	54,5	88	129	123,5	144	130	148		
22° C	1	8,5	38,5	71,5	116	143	146	147	145,5		
37° C	0,5	0,5	2,5	20,5	22,5	113,5	116	118	113		

* Angegeben sind PBE/ml

Tabelle 8

Vergleich zwischen dem Neutralisationstest und der Agar-Gel-Präzipitation

Serum Nr.	Agar-Gel-Präzipi- tationstest	Neutralisationstest
1	+	+
2	+	+
3	+	+
4	-	+
5	+	+
6	-	+
7	+	+
8	+	+
9	+	+
10	+	+
11	+	+
12	+	+
13	+	+
14	+	+
15	+	+
Kontrolle	-	-

Der von uns verwendete Neutralisationstest eignet sich bei Verwendung von nicht-homologen Antiseren dagegen nicht für quantitative Bestimmungen. Der Grund hierfür mag in der unterschiedlichen Antigenstruktur der verschiedenen Virusstämme liegen. Dafür sprechen auch die Untersuchungen von v. Bülow (1967), der bei Verwendung unterschiedlicher Virusstämme verschiedene Neutralisationskinetiken fand.

V. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Die beschriebenen Untersuchungsergebnisse zeigen deutlich, daß das aus infektiöser Eiflüssigkeit gewonnene Virus der infektiösen Bronchitis unter den von uns eingehaltenen Bedingungen in der Lage ist, sowohl in embryonalen Hühnernierenzellen als auch in Hühnerfibroblasten Plaques zu bilden. In seiner Empfindlichkeit entspricht der Plaquetest in embryonalen Hühnerfibroblasten der Bestimmung der ID_{50} im bebrüteten Hühnerei. Der Plaquetest ist dem Hühnerei jedoch deutlich überlegen, wenn anstelle von Hühnerfibroblasten Hühnernierenzellen verwendet werden. Der Unterschied in der Empfindlichkeit zwischen Hühnerfibroblasten und Hühnernierenzellen mag darauf zurückzuführen sein, daß, wie Untersuchungen mit fluoreszierenden Antikörpern ergaben, nur etwa 25% der infizierten Fibroblasten virusspezifisches Material synthetisieren. Darüber hinaus geht aus den durchgeführten Vermehrungsstudien hervor, daß die Eclipse-Phase des IB-Virus in Hühnernierenzellen signifikant kürzer ist als in Hühnerfibroblasten. Auch wird das Optimum der Virusvermehrung in ersteren früher erreicht als in letzteren. Hühnernierenzellen sind daher für die Vermehrung des IB-Virus offensichtlich besser geeignet als Hühnerfibroblasten.

Durch die Ausarbeitung eines Plaquetestes wurden die Voraussetzungen dafür geschaffen, das Virus in einem leicht

herzustellenden Wirtssystem quantitativ zu bestimmen. Da eine lineare Beziehung zwischen der Plaquezahl und der Virusverdünnung nachgewiesen werden konnte, können mit Hilfe des Plaquetestes auch mit nicht an die entsprechenden Zellen adaptierten Viruspräparationen reine Klone isoliert und damit genetische Untersuchungen durchgeführt werden. Daß der von uns verwendete Virusstamm genetisch nicht rein ist, geht schon aus der unterschiedlichen Größe der gebildeten Plaques hervor. Es wäre interessant zu prüfen, inwieweit beim IB-Virus eine Relation zwischen der Virulenz und der Plaquegröße besteht.

Wie die Untersuchungen über die optimale Virusadsorptionszeit ergaben, scheint das IB-Virus eine besonders ausgeprägte Affinität zu den von uns verwendeten Zellen zu besitzen. Bereits nach einer 5 Minuten langen Inkubation der infizierten Zellen bei 37°C war eine Adsorption erreicht, die durch eine längere Bebrütungszeit nicht signifikant erhöht werden konnte.

Die Plaquebildung konnte durch Erhöhung der Bebrütungstemperatur von 37°C auf 40°C nicht beeinflusst werden. Es fand jedoch keine Plaquebildung statt, wenn die infizierten Kulturen bei 35°C inkubiert wurden. Wie Untersuchungen über die Vermehrung des Virus ergaben, werden bei 35°C keine infektiösen Partikel gebildet. Unseres Wissens wur-

da bei keinem der bisher näher untersuchten animalen Viren eine so ausgeprägte Temperaturabhängigkeit gefunden. Beim Virus der Klassischen Geflügelpest konnten Scholtissek und Rott (1969) zeigen, daß die Bildung der virusspezifischen RNS-abhängigen RNS-Polymerase bei Temperaturen unter 34°C stark gehemmt wird. Es ist möglich, daß die Synthese eines entsprechenden Enzyms beim IB-Virus noch empfindlicher gegen niedrige Temperaturen ist.

Aus den beschriebenen Untersuchungsergebnissen geht weiterhin hervor, daß sich der Plaquetest grundsätzlich auch zum Nachweis neutralisierender Antikörper verwenden läßt. Sie machen aber auch von neuem die überaus komplexe Problematik der Virusneutralisation deutlich. So wurde gefunden, daß nur bei Verwendung von homologem Antiserum in jedem Fall eine lineare Abhängigkeit zwischen der Reduktion der Plaquezahl und der Serumverdünnung auftrat. Wurden dagegen Seren aus willkürlich herausgegriffenen versuchten Hühnerbeständen benutzt, so war nur selten eine Korrelation der Plaquezahlen mit der Antikörperkonzentration festzustellen. Diese verschiedenen Ergebnisse können einmal durch feine Unterschiede der Antigenstruktur der Virusstämme bedingt sein, die die Antikörperbildung in den Tieren anregen, zum anderen muß jedoch auch damit gerechnet werden, daß der Antikörpertyp das Neutralisationsbild stark beeinflussen kann. Zur Deutung

der gewonnenen Resultate sind daher noch umfangreiche Untersuchungen notwendig, die nicht nur mit verschiedenen Virusstämmen, sondern auch mit den unterschiedlichen, isolierten Antikörpertypen durchgeführt werden sollten.

Wenn die relativ wenigen durchgeführten Versuche bereits eine Aussagekraft besitzen, so scheint der Serumneutralisationstest der Agar-Gel-Präzipitation überlegen zu sein. Das ist auch weiter nicht verwunderlich, da zur Sichtbarmachung einer deutlichen Präzipitationsbande bestimmt mehr Antikörper notwendig sind als für eine deutliche Neutralisation.

Durch eine etwa 40-fache Reinigung ließ sich ein virus-spezifisches, präzipitierbares Antigen gewinnen, das in der Präzipitation klarere Bilder ergibt als das seither allgemein benutzte Homogenat aus infizierten Eihäuten. Dieses Antigen läßt sich ohne Aktivitätsverlust über eine längere Zeit aufbewahren. Über seine Natur ist noch nichts bekannt. Es ist jedoch anzunehmen, daß es ein Strukturantigen des Viruspartikels darstellt.

Die durchgeführten Untersuchungen haben Ansätze dafür gebracht, das IB-Virus besser in den Griff zu bekommen. Sie haben darüber hinaus aber auch ganz deutlich gezeigt, wie wenig über die biologischen Eigenschaften des Virus bis jetzt bekannt ist. Das unterschiedliche Verhalten dieses Virus in den verschiedenen Zellsystemen wirft u.a. interessante Fragen zur Pathogenese des Virus auf, die

einer intensiven Bearbeitung bedürfen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

1. Bedingungen für einen empfindlichen Plaquetest in embryonalen Hühnerfibroblasten und Hühnernierenzellen für das Virus der infektiösen Bronchitis der Hühner werden beschrieben.
2. Untersuchungen über die Vermehrung des IB-Virus haben ergeben, daß das Virus in verschiedenen embryonalen Hühnerzellen eine unterschiedlich lange Eclipse-Periode besitzt. Analog verhält sie die Latenzzeit. Das Virus vermehrt sich mit der gleichen Rate bei 37° C und bei 40° C. Bei 35° C konnte dagegen keine Virusvermehrung nachgewiesen werden.
3. Versuche mit fluoreszierenden Antikörpern ergaben keinen Hinweis auf eine intranukleäre Virusvermehrung.
4. Der Plaquetest eignet sich grundsätzlich zum Nachweis neutralisierender Antikörper. Er ist darin dem Agar-Gel-Präzipitationstest überlegen.

5. Eine partielle Reinigung eines virusspezifischen, präzipitierenden Antigens wird beschrieben. Es besitzt eine 40-fach höhere spezifische Aktivität als das allgemein verwendete Antigen und ist stabil bei 4° C.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Almeida, J. D. und Tyrrell, D. A. J. (1967)

The morphology of three previously uncharacterized human respiratory viruses that grow in organ cultures.

J. gen. Virol. 1, 175.

Almeida, J. D., Berry, D. M., Cunningham, C. H., Hamre, C. H., Hofstad, M. S., Malucci, L., McIntosh, K. und Tyrrell, D. A. J. (1968)

Coronaviruses.

Nature 220, 650.

Asplin, F. D. (1948)

Identification of infectious bronchitis of chicken in England.

Vet. Rec. 60, 485.

Ayfantis, S. (1956)

Die infektiöse Bronchitis der Hühner in Griechenland.

Delt. Hellen. Kten. Hetair. S. 3.

Babiker, H. A. und Rott, R. (1968)

Biologische Eigenschaften des Virus N.

Zbl. Vet. Med. 15B, 353.

Babiker, H. A. und Rott, R. (1968)

Plaque formation by influenza viruses in monolayers of chicken kidney cells.

J. gen. Virology 3, 285.

Bablanian, R., Eggers, H. J. und Tamm, I. (1965)

Studies on the mechanism of poliovirus-induced cell damage.

1. The relation between poliovirus-induced metabolic and morphological alteration in cultured cells.

Virology 26, 114.

Bauditz, R. (1963)

Der Mikropräzipitationstest im Vergleich zu anderen diagnostischen Schnellverfahren bei der infektiösen Bronchitis der Hühner.

Inaug. Diss., Hannover.

Beach, J. R. und Schalm, O. W. (1936)

A filtrable virus distinct from that of laryngo-tracheitis, the cause of respiratory disease of chicken.

Poultry Sci. 15, 199.

Beaudette, F. J. und Hudson, C. B. (1937)

Cultivation of the virus of infectious bronchitis.

J. Amer. Vet. Med. Ass. 43, 51.

Becht, H. (1968)

Properties of erythrocytes stabilized with sulfosalicylic acid and their use in an indirect hemagglutination test with influenza virus RNP-antigen.

J. Immunol. 101, 18.

Becker, W. B., McIntosh, K., Dees, J. H. und Chanock, R. M. (1967)

Morphogenesis of avian infectious bronchitis virus and a related human virus (strain 229 E).

J. Virol. 1, 1019.

Berry, D. M., Cruickshank, J. G., Chu, N. D. und Wells, R. J. H. (1964)

The structure of infectious bronchitis virus.

Virology 23, 403.

Bijlenga, G. (1956)

Het infectieuze bronchitis virus bij kuikens in Nederland angetoed met behulp van eienting dierexperimentael onderzoek en serumneutralisatieproeven.

Tschr. diergeneeeks. 81, 43.

Brion, A. (1960)

Respiratory disease complex.

1. Conf. World Vet. Poultry Ass., Utrecht.

Bushnell, L. D. und Brandly, C. A. (1933)

Laryngotracheitis in chicken.

Poultry Sci. 12, 55.

Bülow, v. V. (1966)

Infektiöse Bronchitis der Hühner.

1. Viruszüchtung in Zellkulturen aus Hühnerembryonieren.

Zbl. Vet. Med. 13B, 345.

Bülow, v. V. (1967)

Untersuchungen über den Neutralisationstest bei der infektiösen Bronchitis der Hühner.

Zbl. Vet. Med. 14B, 321.

Bülow, v. V. und Schneider, L. G. (1969)

Fluoreszenzserologischer Nachweis des Hühnerbronchitisvirus in Zellkulturen und Küken.

Zbl. Vet. Med. 16B, 10.

Chomiak, W. T., Luginbull, E. R. und Jungherr, L. E. (1958)

The propagation and cytopathogenic effect of an egg adapted strain of infectious bronchitis virus in tissue culture.

Avian Dis. 2, 456.

Crawley, J. F. (1951)

The measurement of antibodies to chick bronchitis virus by use of the serum dilution technique.

Pull. Dis. Contr. Univ. Connecticut storrs. USA.

Crawley, J. F. (1953)

The extent and control of infectious bronchitis in Canada.
Proc. Amer. Vet. Med. Ass. 342.

Cunningham, C. H. und El Dardiry, A. H. (1948)

Distribution of the virus of infectious bronchitis of chicken in embryonated chicken eggs.

Cornell. Vet. 38, 381.

Cunningham, C. H. (1951)

Newcastle disease and infectious bronchitis neutralizing antibody indexes of normal chicken serum.

Amer. J. Vet. Res. 12, 129.

Cunningham, C. H. (1960)

Recent studies on the virus of infectious bronchitis.

Amer. J. Vet. Res. 82, 498.

Cunningham, C. H. (1963)

Newer knowledge of infectious bronchitis virus.

Proc. 17. World Vet. Congr., Hannover. S. 607.

Cunningham, C. H. und Spring, P. M. (1965)

Some studies of infectious bronchitis virus in cell culture.

Avian Dis. 9, 182.

Delaplane, J. P. und Stuart, H. O. (1941)

The modification of infectious bronchitis virus of chicken as the result of propagation in embryonated chicken eggs.

Rhode Island State Coll. Agrc.

Exper. State Bull. 284, 3.

Delaplane, J. P. (1947)

Technique for the isolation of infectious bronchitis or newcastle virus including observation on the use of streptomycin in overcoming bacterial contaminants.

Proc. 19. Ann. Meeting Northeastern Conf. lab. Workers.

Pull. Dis. Contr. North Carolina State Coll., Raleigh, N.C., USA.

Dulbecco, R. und Vogt, M. (1954)

Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses.

J. Exptl. Med. 99, 167.

Eagle, H. (1959)

Amino acid metabolism in mammalian cell cultures.

Science 130, 432.

Esteola, T. (1966)

Studies on the infectious bronchitis virus of chickens isolated in Finnland.

Acta Vet. Scand. Suppl. 18, Helsinki.

Fabricant, J. (1951)

Studies on the diagnosis of newcastle disease and infectious bronchitis virus. IV. The use of the serum neutralization test in the diagnosis of infectious bronchitis.

Cornell. Vet. 41, 68.

Fahey, J. E. und Crawley, J. F. (1956)

Propagation of infectious bronchitis virus in tissue culture.

Canad. J. Microbiol. 2, 503.

Glassi, D. (1956)

Bronchite infettiva del pollo, isolamento del virus e tentativo di vaccinazione con un ceppo a virulenza attenuata.

Att. Soc. Ital. sc. Vet. Perugia, 10, 717.

Hamre, D. und Procknow, J. J. (1966)

A new virus isolated from the human respiratory tract.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 121, 190.

Hipolito, O. (1957)

Avian infectious bronchitis in Brazil.

Arch. esc. Vet. Minas Gerais 5, 131.

Hitchner, B. S., Appleton, S. G. und Winterfield, W. R. (1964)

Evaluation of the immunity response to infectious bronchitis virus.

Avian Dis. 3, 153.

Jungherr, E. L. und Terrel, N. L. (1948)

Naturally acquired passive immunity to infectious bronchitis in chicken.

Amer. J. Vet. Res. 9, 201.

Kawasihma, N. T., Sato, T., Hank, T. Yoshida, T. und Harada, K. (1951)

On newcastle disease and other resembling diseases of chicken which occurred in 1951 at Iruma Country, Saitama Prefecture.

Japan J. Vet. Sc. 13, 321.

Kawamura, H., Isogai, S. und Tsubahara, H. (1961)

Propagation of avian infectious bronchitis virus in chicken kidney tissue culture.

Nat. Inst. Anim. Health. Quart. 1, 190.

Köhler, H. und Burtscher, H. (1959)

Zum Vorkommen der chronischen Atmungskrankheit und der infektiösen Bronchitis der Hühner in Österreich.

Wien Tierärztl. Wschr. 46, 234.

Liebhaber, H. und Takemoto, K. K. (1961)

Alteration of plaque morphology of EMC virus with polycations.

Virology 14, 502.

Luckert, D. P. (1965)

Comparative sensitivities of embryonating chicken eggs and primary chicken embryo kidney and liver cell culture to infectious bronchitis virus.

Avian Dis. 9, 308.

Luckert, D. P. (1966)

Immunofluorescence of avian infectious bronchitis virus in primary chicken embryo kidney, liver, lung and fibroblast cell culture.

Arch. f. Virusforsch. 17, 265.

Mansi, W. (1958)

Slide gel diffusion precipitin test.

Nature 181, 1289.

McIntosh, K., Becker, W. B. und Chanock, R. M. (1967)

Growth in suckling mouse brain of "IBV-like" viruses from patients with upper respiratory tract disease.

Proc. Nat. Acad. Sci. 58, 2268.

Mohanty, B. S. und Chang, S. C. (1963)

Development and ether sensitivity of infectious bronchitis virus of chicken in cell cultures.

Amer. J. Vet. Res. 24, 822.

Mohanty, B. S., DeVolt, M. H. und Faber, E. J. (1964)

A fluorescent antibody study of infectious bronchitis virus.

Poultry Sci. 17, 179.

Moscana, A. (1952)

Cell suspension from organ rudiments of chick embryos.

Exptl. Cell Res. 3, 535.

Nakamura, J., Kuba, N. und Kawakuba, J. (1954)

A virus isolated from infectious bronchitis - like disease of chicken.

Jap. J. Vet. Sc. 15, 80.

Ouchterlony, Ö. (1948)

In vitro method for testing the toxin producing capacity of diphtheria bacteria.

Acta Path. Microbiol. Scand. 25, 186.

Page, C. A. und Cunningham, C. H. (1962)

The neutralization test for infectious bronchitis virus.

Amer. J. Vet. Res. 23, 1065.

Petek, M. (1956)

Su alcuni focolai di bronchite infettiva dei polli.

Vet. Ital. 7, 487.

Pette, J.

Verhalten von Hühnerbronchitisvirusstämmen in der Gewebekultur und Eignung der Gewebekultur zum Nachweis virusneutralisierender Serumantikörper.

Zbl. Vet. Med. 7B, 483.

Raggi, L. G., Lee, G. G. und Willers, H. E. (1960)

Case report avian infectious bronchitis in Hawai.

Avian Dis. 4, 196.

Reed, L. J. und Muench, H. (1938)

A simple method of estimating fifty per cent endpoints.

Am. J. Hyg. 27, 493.

Richter, J. H. M. (1956)

Infektiöse Bronchitis.

Vlaams Diergenessk. Tschr. 25, 133.

Sassenhof, J. (1950)

Eine neuartige enzootisch auftretende Luftröhrenentzündung bei Hühnern.

Münch. Tierärztl. Wschr. 10, 224.

Schalk, A. F. und Hawn, M. C. (1931)

An apparently new respiratory disease on baby chicks.
J. Amer. Vet. Med. Ass. 78, 413.

Schwick, G. und Störiko, K. (1964)

Radiale Immundiffusion.

in: Laboratoriumsblätter für die medizinische Diagnostik.
Mitteilung der Behringwerke AG, Mai, 1964.

Singh, J. P. (1960)

Some properties of infectious bronchitis virus as determined
by thermal and formalin inactivation.

Thesis, Michigan, State Univ.

Swierstra, D. (1947)

Bronchitis infectiosa bij hippen in Nederland.

Tschr. diergeneesk. 72, 745.

Takemoto, K. K. und Liebhaver, H. (1961)

Virus-polysaccharide determining plaque morphology of
EMC virus.

Virology 14, 456.

Van Roekel, H., Clark, K. M., Bullis, L. K., Olesiuk, U. O.
und Sperling, G. F. (1951)

Infectious bronchitis.

Amer. J. Vet. Res. 12, 140.

Van Roekel, H. (1955)

Respiratory disease of poultry.

in: Adv., Vet. Sc. 2, 64.

Weiss, K. E. (1962)

The virus diseases of poultry in South Africa.

S. Afr. Med. J. 36, 172.

Winterfield, W. R., Hitchner, B. S. und Appleton, S. G. (1964)

Immunological characteristics of a variant of infectious
bronchitis virus isolated from chicken.

Avian Dis. 3, 40.

Woernle, H. (1959)

Diagnose der infektiösen Bronchitis der Hühner mit Hilfe
der Präzipitationsreaktion im festen Agarmedium.

Mhft. Tierheilk. 8, 154.

Wright, B. S. und Sagik, W. (1958)

Plaque formation in monolayers of chick embryo kidney cells.

Virology 5, 573.

Herrn Prof. Dr. R. Rott möchte ich für seine großzügige wissenschaftliche und menschliche Unterstützung meinen aufrichtigen Dank aussprechen. Herrn Prof. Dr. H. Geissler danke ich verbindlichst für seine ständige Hilfsbereitschaft und Herrn Dr. H. Becht für seine vielseitige Hilfe, die er mir jederzeit gewährte.

LEBENS LAUF

Am 20. Oktober 1935 wurde ich, Mehmet Kandil, als Sohn des Ahmet Kandil und dessen Ehefrau Habibe Kandil, in Elbistan, Türkei, geboren.

Von 1945 - 1953 besuchte ich die Volksschule in Elbistan. Im Jahre 1953 trat ich ins Gymnasium in Adana ein, wo ich im September 1956 die Reifeprüfung ablegte.

Von 1956 - 1961 studierte ich Veterinärmedizin an der Universität Ankara. Im Juli 1961 kam ich in die Bundesrepublik Deutschland, um meine Sprachkenntnisse zu erweitern. Nach der Rückkehr in meine Heimat schloß ich im Februar 1963 die tierärztliche Prüfung ab. Im April 1963 wurde ich als Veterinäroffizier beim Verteidigungsministerium eingestellt. Danach wurde ich als staatlicher Tierarzt an einem Veterinäruntersuchungsamt ernannt, wo ich bis Anfang Februar 1966 arbeitete.

Seit Februar 1966 bin ich als Stipendiat des Kultusministeriums der Türkei in Deutschland, um mich auf dem Gebiet der Virologie auszubilden.

LEBENSLEISTE

Am 10. Oktober 1910 wurde ich, Robert Schall, als Sohn
des Herrn Schall und der Frau Schall, in
Erlangen, Bayern, geboren.

Vom 10. - 1911 besuchte ich die Volksschule in Erlangen.
In dieser Zeit trat ich der Jugendbewegung bei und war
im September 1911 der Gründung beigefügt.

Vom 1911 - 1912 wurde ich der Volkshochschule in der
Landesstadt Erlangen. Im Jahr 1912 war ich in der Jugend-
bewegung tätig, die mich in der Jugendbewegung zu einer
weiteren Ausbildung in der Jugendbewegung führte.
Im Jahr 1912 wurde ich der Jugendbewegung beigefügt.
Im Jahr 1912 wurde ich der Jugendbewegung beigefügt.
Im Jahr 1912 wurde ich der Jugendbewegung beigefügt.
Im Jahr 1912 wurde ich der Jugendbewegung beigefügt.

Im Jahr 1912 wurde ich der Jugendbewegung beigefügt.
Im Jahr 1912 wurde ich der Jugendbewegung beigefügt.
Im Jahr 1912 wurde ich der Jugendbewegung beigefügt.
Im Jahr 1912 wurde ich der Jugendbewegung beigefügt.

